



Universidad  
Zaragoza



TRABAJO DE FIN DE GRADO  
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE LOS  
SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS EN PROCESOS  
TUMORALES. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

*“Effect of environmental factor on respiratory supercomplexes in tumour processes. A  
bibliographical review”*

Autora:

Irene Manero Roig

Directores:

Dra. Raquel Moreno Loshuertos

Dr. Patricio Fernández Silva

Grupo GENOXPHOS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Universidad de Zaragoza, 2020

## ABREVIATURAS

---

<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AMP</b>	Adenosín monofosfato
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por AMP
<b>ANT</b>	Translocasas del nucleótido adenina
<b>Apaf-1</b>	Factor apoptótico activador de proteasa 1
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>Bax</b>	Proteína X asociada a Bcl-2
<b>Ca-ATPasa</b>	ATPasa de calcio
<b>CASP3</b>	Caspasa 3
<b>Cispt</b>	Cisplatino
<b>CoQ</b>	Coenzima Q / ubiquinona
<b>Cyt c</b>	Citocromo c
<b>DCA</b>	Dicloroacetato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Drp1</b>	Proteína tipo Dynamin 1
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EMT</b>	Transición de célula epitelial a mesenquimal
<b>ETC</b>	Cadena de transporte electrónico
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Dinucleótido de adenina y flavina reducido
<b>Fis1</b>	Proteína de fisión mitocondrial 1
<b>GPX</b>	Glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>HIF/HIF1<math>\alpha</math></b>	Factor inducible por hipoxia
<b>HSP70</b>	Proteína de choque térmico 70kDa
<b>IDH1/IDH2</b>	Isocitrato deshidrogenasa 1/ 2
<b>LC3</b>	Proteínas asociadas a los microtúbulos 1A/ 1B cadena ligera 3B
<b>LKB1</b>	Quinasa hepática B1
<b>MAPK</b>	Proteína quinasas activadas por mitógenos
<b>mM</b>	Milimolar
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>mtROS</b>	Especies reactivas de oxígeno mitocondriales
<b>mTORC1</b>	Blanco mecanístico del complejo 1 de rapamicina
<b>NAD<sup>+</sup>/NADH</b>	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
<b>NADPH</b>	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>NF-kB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas
<b>NRF2</b>	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
<b>OTCs (OTC1)</b>	Proteínas de transporte de cationes orgánicos
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Coactivador 1 $\alpha$ del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas.
<b>PDC</b>	Complejo piruvato deshidrogenasa
<b>PDK</b>	Piruvato deshidrogenasa quinasa
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 quinasa
<b>PMAT</b>	Transportador monoamina plasmático
<b>PMTP</b>	Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
<b>PPP</b>	Ruta de las pentosas fosfato
<b>PRX</b>	Peroxiirredoxina

<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SCs</b>	Supercomplejos
<b>SOD (SOD1/ SOD2/ SOD3)</b>	Superóxido dismutasa
<b>T2D</b>	Diabetes tipo 2
<b>TCA</b>	Ciclo del ácido tricarboxílico
<b>TXN</b>	Tiorredoxina
<b>UCPs</b>	Proteínas desacoplantes

## ÍNDICE

---

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>2.1. CÁNCER: CARACTERÍSTICAS, METABOLISMO Y METÁSTASIS</b>	<b>2</b>
2.1.1. Características	2
2.1.2. Metabolismo	3
2.1.3. Metástasis	4
<b>2.2. MITOCONDRIAS: FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y RELACIÓN CON EL CÁNCER</b>	<b>5</b>
2.2.1. Organización del sistema OXPHOS	5
2.2.2. Mitocondrias y cáncer	7
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>8</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>9</b>
<b>5.1. EFECTOS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)</b>	<b>9</b>
5.1.1. ROS y mitocondria	10
5.1.1.1. Mutaciones en el mtDNA	10
5.1.1.2. Oxidación de los complejos respiratorios	10
5.1.1.3. Peroxidación lipídica	11
5.1.2. Generación y control de los niveles de ROS	12
5.1.3. Fenómeno de hipoxia y ROS	13
5.1.4. ROS y la metástasis	14
<b>5.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA</b>	<b>15</b>
5.2.1. Hipertermia y disrupción de la función mitocondrial	16
<b>5.3. EFECTOS DE LOS FÁRMACOS</b>	<b>19</b>
5.3.1. Metformina	20
5.3.1.1. Acción en la célula tumoral	21
5.3.2. Dicloroacetato	22
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>23</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>24</b>

## 1. RESUMEN

---

Las células cancerosas adoptan un metabolismo basado en la glicólisis aeróbica con el objetivo de obtener la energía e intermediarios necesarios para el crecimiento y proliferación tumoral; es lo que se denomina “efecto Warburg”. En esta reestructuración, la mitocondria juega un papel principal a través del sistema OXPHOS, siendo efectores esenciales las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan en la cadena de transporte electrónico (ETC). Estas ROS son segundos mensajeros en distintas rutas de señalización que contribuyen al desarrollo del tumor. Las células tumorales también incrementan la producción de antioxidantes, evitando que las ROS alcancen niveles citotóxicos dañando, entre otras moléculas, a los complejos y supercomplejos (SCs) mitocondriales.

Dada la importancia de la mitocondria y de la ETC en el desarrollo tumoral, se busca desarrollar tratamientos que los tengan como diana, entre los que destacan la hipertermia y el uso de fármacos. En cuanto a la aplicación de temperatura, hipertermias medias alteran las interacciones entre lípidos y los SCs. Temperaturas algo superiores producen, además, la permeabilización de la membrana, desacoplando el transporte electrónico del gradiente de  $H^+$ . Se pierde la homeostasis del  $Ca^{++}$ , regulador de los SCs, y disminuyen las defensas antioxidantes. Como consecuencia, las ROS alcanzan niveles citotóxicos y se da la muerte celular. Estos últimos años se buscan fármacos cuya diana sea la ETC. Un ejemplo es la metformina, que inhibe el CI reduciendo el flujo de la ETC y por tanto la producción de ATP, así como de ROS. Como resultado, se detienen los procesos de consumo de ATP como la síntesis de intermediarios, necesarios para la proliferación celular, y las ROS caen a niveles por debajo de los mínimos tumorigénicos.

## 1. ABSTRACT

---

Cancer cells adopt a metabolism based on aerobic glycolysis to obtain the energy and metabolic intermediates necessary for tumour growth and proliferation; this is what is called “Warburg effect”. Mitochondria play a main role through the OXPHOS system in this cellular adaptation, being the reactive oxygen species (ROS) generated in the electron transport chain (ETC) essential effectors. These ROS are second messengers in different signalling pathways against stress and apoptosis, in addition to activating others that promote proliferation and tumorigenesis, contributing to tumour development. Tumour cells also promote the production of antioxidant to prevent ROS from reaching cytotoxic levels and damaging mitochondrial complexes and supercomplexes (SCs), among other molecules.

Given the importance of mitochondria and the ETC in tumour development, a promising strategy is to develop treatments that target them, among which hyperthermia and the use of drugs stand out. Regarding temperature application, medium hyperthermias alter the interactions between lipids and the SCs. Higher temperatures also cause the permeabilization of the membrane, uncoupling the electron transport from the  $H^+$  gradient.  $Ca^{++}$  homeostasis, a regulator of SCs, is also lost, and antioxidant defences are diminished. Therefore, ROS reach cytotoxic levels that lead to cell death. In recent years, drugs that target the ETC are being sought. An example is metformin, which inhibits CI by reducing the flux of the ETC and therefore the production of ATP, as well as ROS. As a result, ATP consumption processes such as the synthesis of intermediates necessary for cell proliferation, are stopped, and ROS fall to levels below tumorigenic minima.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

### 2.1. CÁNCER: CARACTERÍSTICAS, METABOLISMO Y METÁSTASIS

#### 2.1.1. Características

El término cáncer engloba un conjunto de más de 100 enfermedades diferentes; todas ellas resultado de un crecimiento anormal de las células, que tienden a proliferar de manera incontrolada. Estas células pueden invadir tejidos próximos e, incluso, expandirse a otras partes del organismo a través de la sangre y sistema linfático en un proceso conocido como metástasis.

Lo que conduce al desarrollo inicial del cáncer son los cambios dinámicos que se dan en el genoma, resultado de mutaciones por las que los genes oncogénicos (que estimulan la proliferación) ganan función y los genes supresores de tumores (relacionados con el control del ciclo celular y apoptosis) la pierden. Como consecuencia, las células cancerosas presentan defectos en las rutas regulatorias que controlan la proliferación y la homeostasis celular (1,2). Estos daños en el DNA que llevan al desarrollo del cáncer pueden deberse a errores endógenos, como son fallos en la replicación del DNA o daños causados por exposición a radicales libres; pero también pueden resultar de la acción de agentes exógenos, como son la radiación ionizante o UV. Normalmente, la célula posee mecanismos para reparar los errores, pero cuando fallan, resultan en cambios permanentes del genoma (2).

Diversas evidencias apuntan a que la tumorigénesis o carcinogénesis en humanos supone la sucesión de una serie de etapas que llevan a la progresiva transformación de la célula hacia el estado neoplásico, de manera que logre su supervivencia, proliferación y diseminación por el organismo (1,3). Se define como neoplasia a la “formación anormal en alguna parte del cuerpo, de un tejido nuevo de carácter tumoral, benigno o maligno” (Oxford Languages).

Entre las capacidades biológicas que estas células van adquiriendo durante el proceso, destacan seis principalmente (*Figura 1*): un mantenimiento de la señalización proliferativa en el tiempo, insensibilidad a los supresores de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, inducción de la angiogénesis prolongada y capacidad de invasión de tejidos y metástasis. Como causante de los cambios, se encuentra sobre todo la inestabilidad genómica— que permite una gran diversidad génica mediante mutaciones aleatorias o la reorganización de los cromosomas— pero también el proceso de inflamación celular (1,3). En un principio, cabría pensar que el proceso de inflamación serviría como defensa ante el desarrollo tumoral y sin embargo, se ha visto que potencia la tumorigénesis mediante el suministro de: (i) factores de crecimiento y supervivencia, (ii) enzimas que modifican la matriz extracelular facilitando la angiogénesis, invasión y metástasis y (iii) sustancias químicas como las ROS, con efecto mutagénico en los alrededores tumorales, acelerando el proceso de tumorigénesis (3). En los últimos años, se han añadido otros dos eventos de importancia para el paso a célula tumorigénica maligna (*Figura 1*): la reprogramación del metabolismo energético que permite la proliferación y crecimiento celular continuo, y la evasión de la destrucción inmune (3).

Cada uno de estos cambios fisiológicos que se van adquiriendo en el desarrollo del tumor, supone una ruptura exitosa del mecanismo de defensa anti-cáncer. Sin embargo, cabe destacar que dichos cambios o capacidades se van obteniendo a diversos tiempos según el tumor y que el orden de adquisición de las mismas puede variar (1,3).



Figura 1. Características adquiridas por las células en el cambio al fenotipo tumoral o marcadores del cáncer. Se indican con una flecha azul claro los dos marcadores encontrados más recientemente, tras los seis originales. Con una flecha azul oscuro, se señalan los causantes de todas las características ganadas (Hanahan D. & Weinberg RA., 2011)

Los tumores son tejidos complejos, compuestos por muchos tipos celulares interaccionando entre sí. Las células cancerosas, por un lado, inician los tumores y dirigen su progresión; por otro lado, las células no cancerosas forman un estroma asociado al tumor y participan activamente en la tumorigénesis, contribuyendo al desarrollo de algunas de las características mencionadas. Así, para entender la biología de los tumores, también hay que tener en cuenta el “microambiente tumoral” (3), ya que juega un papel imprescindible en la transición de lesiones pre-cancerosas a carcinogénesis al ejercer una presión de selección hacia las células proliferativas (4).

### 2.1.2. Metabolismo

La proliferación celular, proceso que se ve aumentado durante la tumorigénesis, requiere de nutrientes, energía y gran actividad biosintética para duplicar los componentes celulares en cada ciclo celular. Como consecuencia, la actividad metabólica de estas células proliferativas difiere de la normal: aumenta el ratio de la glucólisis, la producción de lactato y la síntesis de lípidos y otras macromoléculas (5).

En los años 20, Otto Warburg observó que las células tumorales metabolizaban la glucosa por la ruta de la glucólisis y convertían el piruvato en lactato en vez de oxidarlo hasta el final en la mitocondria, incluso en presencia de oxígeno, de manera que consumían mucha más glucosa. A este fenómeno se le llamó “efecto Warburg” y se considera como la séptima característica de las células a la hora de pasar a tener un fenotipo de célula cancerosa (4–7).

Ante el desperdicio energético que suponía la secreción de lactato al medio, Warburg propuso que estas células trataban de compensar una deficiencia en el metabolismo oxidativo mediante el aumento de flujo glucolítico. Sin embargo, estudios posteriores, demostraron que las líneas celulares tumorales con capacidad proliferativa que presentaban el “efecto Warburg” no siempre tenían defectos en el metabolismo oxidativo (5,7).

Así, para explicar el “efecto Warburg”, se propuso que éste confería a las células cancerosas una ventaja selectiva a la hora de sobrevivir y proliferar en el medioambiente tumoral, ya que a medida que el tumor se va expandiendo, crece más allá del lugar donde llegan los vasos sanguíneos, por lo que se produce hipoxia en parte del mismo y se activa la expresión del Factor

de Inducción de Hipoxia (HIF) que a su vez, induce la expresión de genes metabólicos que aumentan el flujo glicolítico (4,6,8). De esta manera, una menor dependencia en la respiración aeróbica sería beneficiosa. Sin embargo, esto no explicaba completamente el cambio en el metabolismo que además, se produce incluso antes de que los tumores experimenten la hipoxia en su interior (4,6).

Por otro lado, se observó que las células que mantenían la respiración celular activa crecían de forma más lenta, por lo que la glicólisis aeróbica debía jugar un papel esencial en la progresión del tumor. Esto implicaba que el “efecto Warburg” era resultado tanto de una adaptación de las células al microambiente (hipoxia), como de cambios génicos (activación de oncogenes, mutaciones en el mtDNA); el resultado del cambio de metabolismo suponía una serie de ventajas de adaptación, proliferación y supervivencia de las células cancerosas (4,6,7).

Hay que tener en cuenta que las células proliferativas no requieren solo de ATP, sino también de una serie de macromoléculas como son los ácidos nucleicos, lípidos, proteínas... De manera que uno de los motivos por los que se cree que se da este alto flujo glucolítico es porque permite usar el nutriente extracelular más abundante (la glucosa) y, aunque el rendimiento en ATP por molécula de glucosa es bajo, si el flujo es lo bastante grande, el % de ATP obtenido puede exceder al que se produce mediante la fosforilación oxidativa. Además, la producción de ATP es más rápida, lo que conviene en la alta proliferación del cáncer. Por otro lado, la degradación de la glucosa permite obtener los intermediarios necesarios para completar los procesos de biosíntesis de las macromoléculas que se emplearán en el crecimiento y proliferación del cáncer (5). Esto ayuda a explicar la alta demanda de glucosa, ya que parte se desvía generar intermediarios y requerir ATP extra en la síntesis de las biomoléculas pertinentes.

Sin embargo, este razonamiento sigue sin explicar la alta producción del ácido láctico, que debe provenir también del metabolismo de sustratos no glucolíticos como es la glutamina. Otra explicación complementaria a por qué el lactato producido es tan alto, es que la glicólisis supera la velocidad máxima de la oxidación del piruvato (4,6,7). Primeramente, se pensaba que la secreción de lactato al exterior era una pérdida energética, sin embargo se ha visto que células del tumor en condiciones de normoxia pueden incorporarlo y terminar de oxidarlo mediante el sistema OXPHOS. Además, genera un ambiente ácido que favorece el crecimiento del tejido canceroso sobre el normal, así como la metástasis del mismo (6,7).

Así, esta reorganización de las actividades metabólicas permite dar soporte a las demandas bioenergéticas, la síntesis macromolecular y finalmente, la división celular (5).

### **2.1.3. Metástasis**

Antes o después, durante el desarrollo de la mayor parte de cánceres, las masas tumorales son capaces de invadir tejidos vecinos para viajar a lugares más lejanos en los que quizás, puedan generar nuevos focos de crecimiento o metástasis (1).

Para poder generar metástasis, las células tienen que sufrir alteraciones en su forma, así como en la manera en la que se unen al resto de células y a la matriz extracelular. El nuevo *cuerpo metastásico es una mezcla de las células cancerosas y células de soporte propias del tejido*. Estas células metastásicas establecen un microambiente que facilite la angiogénesis y proliferación del tumor secundario (1,3,9). Antes de su diseminación, el cuerpo tumoral primario



invade el tejido de su alrededor, los vasos sanguíneos o el sistema linfático (intravasación) y, tras eludir la defensa inmune, termina por colonizar el nuevo tejido (extravasación). Tres mecanismos explican la invasión por parte de las células tumorales: su rápida multiplicación, de manera que el tumor crece y se infiltra por presión mecánica; la destrucción del tejido del propio organismo por los productos que generan; y la falta de adhesión entre ellas, así como el aumento de su motilidad. Los mecanismos no son excluyentes entre sí, de manera que la metástasis es el resultado de una combinación de todos ellos así como de otros factores desconocidos (4,9,10).

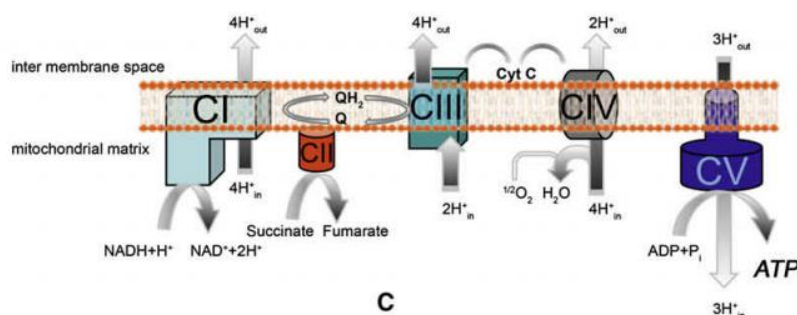
## 2.2. MITOCONDRIAS: FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y RELACIÓN CON EL CÁNCER

### 2.2.1. Organización del Sistema OXPHOS

Las mitocondrias son orgánulos delimitados por dos membranas muy especializadas que dan lugar al espacio intermembrana y la matriz, en la que se producen gran cantidad de reacciones y donde se encuentra el DNA mitocondrial (mtDNA). La membrana externa incorpora una serie de proteínas (llamadas porinas) que la hacen permeable a moléculas con una masa molecular menor a 5 kDa, de manera que el espacio intermembrana tiene una composición similar al citosol en cuanto a moléculas pequeñas. Por otro lado, la membrana interna es muy impermeable a las pequeñas moléculas que se metabolizan en el interior o que se requieren por parte de las enzimas mitocondriales. Además, se encuentran embebidos en ella los distintos complejos de la cadena respiratoria, esenciales para la fosforilación oxidativa, proceso por el que se genera la mayor parte del ATP celular. Esta membrana forma una serie de pliegues (crestas) que se extienden por la matriz aumentando su área (11).

Cuando en la glicólisis se convierte la glucosa en piruvato, se libera solo una pequeña parte del total de energía que, potencialmente, se puede obtener con su oxidación. Es en las mitocondrias donde se completa el metabolismo de azúcares: el piruvato se oxida por el  $O_2$  a  $CO_2$  y  $H_2O$ , con lo que se consiguen unas 15 veces más ATP que con la glucólisis (11). También se pueden usar los ácidos grasos como fuente de energía que, como el piruvato, generan acetil-coA una vez en la matriz. Cuando los carbonos del acetil-coA se oxidan a  $CO_2$ , se generan NADH y  $FADH_2$ , transportadores de electrones que los llevarán a la membrana interna mitocondrial, donde se encuentra el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (11).

El sistema OXPHOS (*Figura 2*) está compuesto por 5 complejos: cuatro de ellos con capacidad oxidorreductasa y un quinto que es la ATP sintasa.



*Figura 2. Representación esquemática del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y funciones de cada uno de los complejos que lo conforman (Acín-Pérez, Fernández-Silva, Peleato, Pérez-Martos, & Enríquez, 2008).*

Los complejos I y II transfieren los electrones desde el NADH y  $FADH_2$ , respectivamente, a la ubiquinona o coenzima Q, (CoQ) que se encuentra también en la membrana interna; a continuación, el complejo III pasa los electrones de la ubiquinona reducida (ubiquinol) al

citocromo c (cyt c), que se encuentra en el espacio intermembrana, y que cede los electrones al complejo IV, en el que finalmente son transferidos al oxígeno molecular, dando lugar a  $H_2O$ . Los complejos I, III y IV tienen la capacidad de traslocar protones desde la matriz al espacio intermembrana de forma acoplada al transporte de electrones y, este gradiente protónico es aprovechado por el complejo V (ATP sintasa) para sintetizar ATP a partir de ADP (12,13).

Históricamente, se han propuesto dos modelos para tratar de explicar la organización supramolecular de los complejos respiratorios. El primer modelo propuesto fue el modelo sólido, en el que se postulaba que todos los componentes de la cadena respiratoria se encontraban en la mitocondria como una sola unidad de manera que se aseguraba una alta eficiencia catalítica (14). Sin embargo, desde 1986, el modelo fluido fue ganando importancia. Este postula que los complejos del I al IV difunden libremente por la membrana interna de manera que el transporte electrónico se produce por colisiones al azar entre ellos; estos complejos están conectados mediante la coenzima Q y el citocromo c (12–14). Este modelo explicaba las observaciones experimentales que mostraban que los cinco complejos podían aislarse individualmente y ser completamente funcionales (12,13).

En los últimos años, nuevas evidencias han demostrado interacciones estables entre los complejos; los complejos I, III y IV aparecen formando distintos supercomplejos a la hora de realizar su función (13,15). Esto se ha visto mediante el uso de geles electroforéticos cuasi-nativos que mostraban una co-migración de estos. Además, desde un punto de vista funcional, los supercomplejos permitirían un transporte más eficiente de los electrones y una estabilización de los propios complejos que los forman (15).

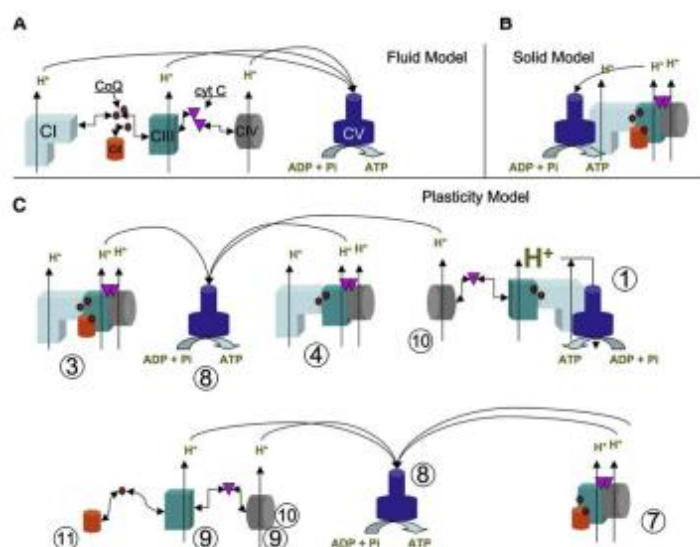


Figura 3. Representación esquemática de los modelos fluido (A), sólido (B) y el modelo de plasticidad (C) mostrando las distintas organizaciones propuestas para que OXPHOS lleve a cabo su función (Acín-Pérez, Fernández-Silva, Peleato, Pérez-Martos & Enríquez, 2008)

Ante los resultados contradictorios que sostenían tanto al modelo fluido como al sólido, se propuso el modelo de plasticidad, que representa un punto intermedio entre los otros dos y propone que la asociación entre los complejos es dinámica, lo que da lugar a una variedad de posibilidades. Los distintos ratios entre complejos individuales y SCs va a depender del tipo celular y del estado metabólico en el que se encuentre la célula en ese momento (14).

Asimismo, este modelo sugiere la existencia de más de una población de CoQ, ya que la interacción entre CI y CIII requiere de una subpoblación de estas biomoléculas que se dedicará preferencialmente a transportar electrones del NADH ( $\text{CoQ}_{\text{NADH}}$ ). Por su parte, la asociación entre CIII y CIV también separa dos poblaciones de cyt c; por un lado el asociado al respirasoma que transportará electrones del NADH ( $\text{cyt}_{\text{cNADH}}$ ) y por otro el asociado a CIII+ CIV que transportará preferentemente electrones provenientes del FAD ( $\text{cyt}_{\text{cFAD}}$ ). Sin embargo, tanto el CoQ como el cyt c se encuentran en gran parte en forma libre, presumiblemente en equilibrio con la población asociada a los SCs (14–16).

### **2.2.2. Mitochondrias y cáncer**

Además de proveer a la célula de energía, las mitocondrias cumplen otras funciones esenciales: en ellas se lleva a cabo parte de la biosíntesis de diversas moléculas, son capaces de controlar la homeostasis redox de la célula, la inmunidad innata y la apoptosis, también generan las especies reactivas de oxígeno (ROS), así como regulan la señalización celular (controlan el calcio citosólico); esto las hace excelentes sensores del estrés, permitiendo la adaptación celular a las condiciones bajo las que se encuentre (17–19).

Inicialmente, se pensó que el efecto Warburg se debía a que el sistema OXPHOS estaba dañado (17). Sin embargo, se vio que muchas de las células cancerosas tienen esta función intacta y que la mitocondria participa de esta y otras muchas maneras en la tumorigénesis, ayudando al crecimiento y supervivencia de las células cancerosas en ambientes que pueden ser más perjudiciales para ellas como son la hipoxia, la falta de nutrientes, etc. El estado o función mitocondrial también condiciona la susceptibilidad celular a la apoptosis y al estrés oxidativo. Así, las mitocondrias tienen un papel en el inicio del desarrollo del cáncer, su proliferación, supervivencia y metástasis (17,19).

Una de las formas en la que las mitocondrias juegan un papel en la tumorigénesis es mediante la producción de ROS, que se encuentra aumentada en las células cancerosas. Las ROS oxidan macromoléculas como los lípidos o las proteínas pero, sobre todo, tiene importancia la oxidación del DNA, que puede llevar a una inestabilidad genómica (17) que ayuda a la adquisición por parte de la célula de nuevas funciones como son la resistencia a la apoptosis o la capacidad de migración y de invasión, favoreciendo la tumorigénesis (20). Así las ROS favorecen una acumulación de mutaciones en el mtDNA que además altera el estado biosintético de la mitocondria y su bioenergética (21). Este ajuste de la capacidad del sistema OXPHOS a las necesidades de la célula también se consigue con la señalización retrógrada que llevan a cabo las ROS desde la mitocondria al núcleo (19,21). Las ROS actúan como segundos mensajeros influenciando la expresión génica, el metabolismo energético, la proliferación celular y la capacidad de diferenciación (21).

No hay que perder de vista sin embargo, que un exceso de ROS puede tener efectos citotóxicos que induzcan la muerte celular por apoptosis o necrosis, por lo que en las células cancerosas, las rutas antioxidantes se encuentran sobreexpresadas de manera que permiten un balance entre su producción y estimulación de la proliferación, migración celular y metástasis, y la producción en enzimas antioxidantes (17).

### 3. OBJETIVOS

---

El objetivo principal de este trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica acerca del efecto de diversos factores sobre la organización de la ETC y su relación con los procesos de tumorigénesis y metástasis, con la finalidad de alcanzar unos objetivos más concretos:

- Determinar los motivos por los que las ROS están elevadas en las células tumorales
- Establecer los mecanismos mediante los que las ROS mitocondriales promueven el fenotipo tumoral y la metástasis
- Entender el papel de las ROS en las consecuencias que tiene la hipoxia sobre las células tumorales
- Determinar las características fenotípicas que hacen a las células tumorales más sensibles a la temperatura
- Establecer los mecanismos por los que el aumento de temperatura dificulta la proliferación de las células tumorales pudiendo conducir las a la muerte celular
- Comprender el modo de acción de diversos fármacos sobre la ETC en el tratamiento contra el cáncer

### 4. METODOLOGÍA

---

Con el fin de cumplir los objetivos propuestos, se ha llevado a cabo una búsqueda exhaustiva de artículos científicos publicados sobre la cuestión. Estos artículos se han recogido a partir de las bases de datos de Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Google scholar (<https://scholar.google.es/schhp?hl=es>).

Los términos introducidos para la realización de la búsqueda han sido “Molecular basis of cancer”, “mitochondrial function”, “oxphos system”, “ROS homeostasis”, “cancer AND oxidative stress”, “Hyperthermia AND cancer”, “Hyperthermia AND oxphos system”, “metformin and cancer”, “metformin AND complex I”, “dichloroacetate AND cancer”, “DCA AND mitochondrial respiratory system” y combinaciones de estos. La búsqueda se ha hecho siempre en inglés, ya que el número de publicaciones a las que se accede es mayor, y el periodo de tiempo empleado para ello se ha extendido de abril a agosto de 2020.

A partir de la búsqueda se han encontrado una serie de artículos de los que se ha hecho una selección. Los criterios para ello han sido la relevancia y la calidad: determinando su importancia en el marco del tema tratado mediante una lectura del *abstract* y, en su caso, la introducción y las conclusiones. Con respecto a la calidad, se ha procurado utilizar bibliografía lo más reciente posible, pero en algunos casos, para obtener la información, ha sido necesario retroceder hasta la década de 1990; además, para explicar el “efecto Warburg” así como hipótesis sobre la organización de los complejos del sistema OXPHOS ya obsoletas, también ha sido necesario retroceder más en la línea temporal. Por otro lado, se ha tenido en cuenta que los artículos seleccionados hubiesen sido publicados en revistas científicas, en lo posible con un alto índice de impacto, lo que les da una mayor validez dentro del campo. Además de los artículos seleccionados inicialmente para su uso en el trabajo, se han utilizado otros en base a propia bibliografía ya que, aunque fuesen algo anteriores, permitían ahondar más en el tema. Por último, a través de artículos descartados porque no incluían información considerada adecuada para el tema, se ha encontrado bibliografía útil desde el apartado “*Similar articles*”.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

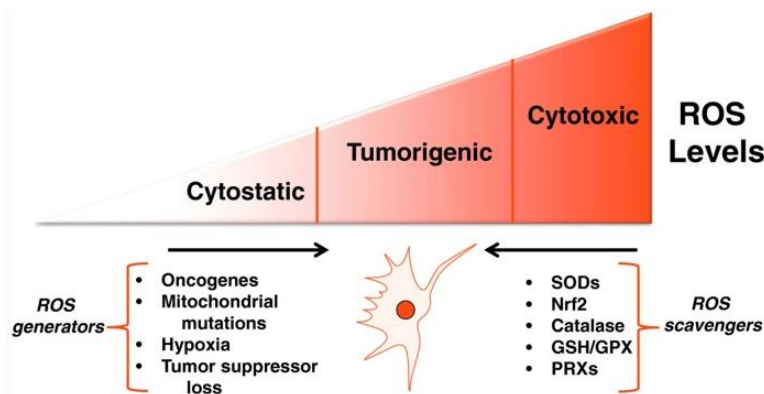
### 5.1. EFECTOS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

En condiciones normales, las ROS producidas por la mitocondria en la ETC participan en rutas de señalización gracias a su pequeño tamaño, rápida difusión y la gran cantidad de mecanismos que hay tanto para producirlas, como para eliminarlas rápidamente (22,23).

Actúan principalmente a nivel de proliferación celular, apoptosis y expresión génica, entre otras. El aumento de la expresión génica se logra mediante la activación de factores de transcripción como el factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), que se encuentra asociado a una proteína inhibidora en el citoplasma y que, ante la presencia del  $H_2O_2$ , se libera y transloca al núcleo.

Si miramos su acción directamente en proteínas ya transcritas, las ROS van a activar quinasas (como la MAPK) e inactivar fosfatasa, cambiando el estado de fosforilación de proteínas de la ruta que se está regulando (23). Un ejemplo de proteínas reguladas por las ROS son las tirosín fosfatasa, cuya acción depende de la oxidación de sus residuos de Cys, de manera que su inactivación a través de las ROS promoverá la fosforilación de los residuos de tirosina de otras proteínas (24). Sin embargo, también se ha visto que juegan un papel importante en la señalización celular activando rutas que promueven la proliferación y tumorigénesis (8,14,17,25); de hecho, niveles bajos de  $H_2O_2$ , pueden oxidar de manera reversible los residuos de cisteína presentes en las proteínas, potenciando la proliferación celular y la adaptación de las células al estrés metabólico (25). En condiciones patológicas, estas ROS contribuyen al inicio del desarrollo del cáncer, a la amplificación del fenotipo tumoral (22), así como activan rutas que favorecen la biogénesis mitocondrial, compensando las deficiencias del sistema OXPHOS (21).

Las ROS tienen un amplio rango de acción y podrían considerarse tanto anticancerígenas: promueven la senescencia, apoptosis, necrosis, detienen el ciclo celular e inhiben la angiogénesis; como biomoléculas pro-cancerígenas: oxidan bases del DNA, promueven la proliferación celular, invasividad, angiogénesis, metástasis e inhiben la apoptosis, así como regulan el metabolismo de las células cancerosas. Su efecto depende principalmente de su concentración en la célula, pero también del tipo de ROS presentes, del tiempo de exposición de las defensas antioxidantes para su eliminación y de los sistemas de reparación del daño oxidativo (*Figura* ) (26).



*Figura 4. Efecto de las ROS en la célula según su concentración. Las células tumorales mantienen los niveles de ROS en el rango tumorigénico (que permite la proliferación y metástasis) gracias al balance adecuado entre su generación y la actividad antioxidante de ciertas proteínas que se expresan en la célula. (Sullivan et al. 2014)*

Las ROS juegan un papel principal a nivel de iniciación y progresión del cáncer a través de sus efectos en el ciclo celular, la expresión génica, el daño al DNA y la muerte celular (26). Para su acción tumorigénica, activan rutas de señalización (como PI3K) y factores de transcripción (como HIF y el NF- $\kappa$ B) (5).

#### **5.1.1. ROS y mitocondria**

Si nos centramos en los daños que causan a nivel del orgánulo mitocondrial, estas ROS atacan el mtDNA llevando a la acumulación de mutaciones, oxidan los complejos respiratorios y provocan la peroxidación de los fosfolípidos, en particular de la cardiolipina (14,25,27); de manera que su acumulación termina por activar las rutas de señalización de muerte celular, conduciendo a la apoptosis (8).

##### **5.1.1.1. Mutaciones en el mtDNA**

En el inicio del desarrollo del cáncer, una diana importante de las mtROS es el mtDNA ya que su mutación promueve la tumorigénesis (22). Resumiendo lo visto en los apartados previos, entre las causas asociadas a la alteración del metabolismo energético en células cancerosas encontramos mutaciones en el DNA nuclear (nDNA) y, sobre todo, en el mitocondrial (mtDNA), así como deleciones, inserciones y cambios en el número de copias del mtDNA (22,28). Los nucleótidos más susceptibles al ataque por parte de las ROS son las guaninas, que pasan a 8-hidroxiguaninas y se consideran por tanto, marcadores del daño sobre el DNA (29,30).

La mayor fuente de daño en el DNA son las ROS y como consecuencia de las alteraciones en el mtDNA, la ETC se ve comprometida, contribuyendo al cambio hacia la glicólisis aeróbica, que es marcador de la progresión metastásica (28,29). No tienen por qué inactivar la fosforilación oxidativa necesariamente, pero sí afectan al estado redox de la ETC y su eficiencia y por tanto favorecen la generación de ROS (22). Con las mutaciones, disminuye la eficiencia del proceso de fosforilación oxidativa, aumenta la producción de ROS y se retroalimenta el proceso (29). Las mutaciones sin sentido o de cambio de sentido están relacionadas con una alteración de la ETC así como de la ATP sintasa. También son capaces de cambiar el potencial de membrana o el estado redox de los transportadores de electrones (22). Además, un bajo número de copias del mtDNA se relaciona con la metástasis, ya que induce la transición de célula epitelial a mesenquimal (EMT) mediante la señalización mitocondrial retrógrada (28).

El mtDNA es más susceptible al daño por las ROS que el nDNA por varios motivos: se encuentra más próximo a la principal fuente de ROS, no tiene intrones por lo que las modificaciones serán casi siempre sobre DNA codificante, ni tiene histonas que puedan protegerlo; además, la célula tiene menor capacidad de reparación del mtDNA por lo que se acumulan más rápidamente las mutaciones (29,30).

##### **5.1.1.2. Oxidación de los complejos respiratorios**

La capacidad de producción de ROS por parte de las células tumorales se potencia por factores tales como las lesiones oncogénicas al DNA, como son mutaciones en el mtDNA que afectarán a los complejos OXPHOS y al microambiente del tumor (5,27); también juega un papel importante la organización de la ETC (14). En la tumorigénesis, se ha visto en general una disminución de los supercomplejos respiratorios, así como alteraciones en los mismos que estarían asociadas a una mayor producción de ROS (14).

Al ser los mayores productores de ROS, los complejos mitocondriales están expuestos a altas concentraciones y son, por tanto, muy susceptibles de ser atacados por ellas. También son susceptibles de la oxidación por parte de las ROS producidas fuera de la mitocondria (30). Además, la relación entre las ROS y los complejos mitocondriales es bidireccional y una mayor presencia de ROS (estrés oxidativo), está detrás de alteraciones en la plasticidad de los SCs, que puede causar un descenso en la estabilidad o unión de los mismos y, como consecuencia, una menor obtención de energía y, a su vez, una mayor producción de ROS (14,27).

Ante el estrés oxidativo, se da la disociación de los complejos I y III, de manera que el paso de electrones deja de ser tan eficiente, ya que ahora van a difundir por la membrana y su transporte va a depender del encuentro aleatorio entre complejos y transportadores electrónicos, lo que puede desembocar en una mayor producción de ROS (27,29). Estas ROS retroalimentan el proceso causando la desorganización de los supercomplejos, que, junto con el transporte electrónico menos eficiente, conduce a una menor tasa de respiración y síntesis de ATP por el sistema OXPHOS (27,29).

### **5.1.1.3. Peroxidación lipídica**

Las ROS también pueden afectar a la estabilidad de los SCs mediante la oxidación de la cardiolipina, fosfolípido que se encuentra solo en membranas que presentan la ETC, como es la membrana interna mitocondrial (31).

A pesar de que en general, los fosfolípidos son bastante móviles en la membrana, la cardiolipina se encuentra fuertemente asociada a los complejos proteicos así como a otras proteínas de membrana (31); de hecho, se ha visto que la cardiolipina estabiliza tanto los complejos individuales como los SCs, así como también se encarga de estabilizar la membrana mitocondrial (27,32). La cardiolipina es, por tanto, una biomolécula necesaria para el correcto funcionamiento de los complejos (27). De esta manera, ante una deficiencia de cardiolipina como consecuencia de su oxidación, se altera la fluidez y la estabilidad de la membrana, lo que lleva a disminuir el ratio de ATP producido/oxígeno consumido, así como el potencial de membrana (30,32). En una situación normóxica, la cardiolipina permite la máxima actividad de transporte electrónico posible (31).

La peroxidación de la cardiolipina causa la disociación de los SCs, pero además, afecta en particular a la estabilidad de los complejos III, IV y V, así como a la función del translocador ADP-ATP (27,32); sin embargo, también se ha visto que la cardiolipina, a pesar de estabilizar las asociaciones entre los complejos, no es esencial para su formación, ni para la formación del dímero de ATP sintasa (30,32). Un papel importante de la cardiolipina es el de evitar que el CIV pase a un estado inactivo (30,32) ya que es necesaria para su correcta interacción con el cyt c (33,34); además parece estar relacionada con la capacidad de asociación del cyt c a la membrana interna (32). Se ha visto también que para su actividad, los complejos I y III requieren de un ambiente lipídico estable (34).

La propia ubiquinona que forma parte de la cadena de transporte electrónico, sirve como antioxidante. En la forma reducida, protege los lípidos de la peroxidación y de esta manera, indirectamente, a los propios complejos proteicos. Además, se protege a sí misma, ya que la peroxidación lipídica lleva a que la ubiquinona adopte una forma más polar que no puede seguir participando en la ETC (33). La bajada de las reservas de ubiquinona ante la peroxidación lipídica

contribuye a la inhibición de la ETC. De hecho, se limita el transporte electrónico principalmente porque se impiden las reacciones relacionadas con la ubiquinona que se catalizan en los complejos I y II (34).

### **5.1.2. Generación y control de los niveles de ROS**

A pesar de que las células cancerosas suplen sus demandas energéticas y acumulan los precursores biosintéticos necesarios en gran medida gracias a la glicólisis aeróbica, también llevan a cabo la respiración mitocondrial, que aporta una fracción del ATP que usan (35). Las mitocondrias serán asimismo fuente de NADH y de intermediarios del TCA, necesarios para la síntesis de lípidos, aminoácidos y proteínas (8).

Las mitocondrias son, además, el mayor contribuidor de ROS en la célula. Se generan cuando no se da la reducción completa del oxígeno en el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial y entre las ROS se encuentran el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) (8). Dentro de la mitocondrial, los grandes productores de las ROS son los complejos I y III, ya que las ubiquinonas y la familia de la cyt c en el CIII no retienen los intermediarios parcialmente reducidos de oxígeno en sus sitios activos (14,30,34). Mientras que los complejos CI y CII liberan las ROS a la matriz mitocondrial, el CIII lo puede hacer también hacia el espacio intermembrana, facilitando el ataque de estas ROS a componentes citoplasmáticos (36).

Las células cancerosas tienen los niveles de ROS aumentados por diversos motivos: bien generan mayor cantidad de ROS debido a la mayor actividad metabólica y siguen manteniendo las mismas defensas antioxidantes, bien disminuyen estas defensas ante la misma producción de ROS, bien se dan fallos en el sistema de reparación del daño oxidativo o se produce cualquier combinación de las tres. Defectos en la reparación del DNA así como polimorfismos en las enzimas que se encargan de este proceso contribuyen al inicio de ciertos cánceres (26).

Sin embargo, las ROS no deben llegar a niveles dañinos para las células, por lo que también se incrementa la expresión de proteínas antioxidantes como son la familia de las SOD (SOD1, SOD2 y SOD3), la glutathion peroxidasa (GPX), la tioredoxina (TXN), peroxirredoxina (PRX) y catalasa (5,14,17,37); y componentes antioxidantes no enzimáticos como son el glutathion y la vitamina E (34). Las superóxido dismutasas mitocondriales SOD2 y SOD3 son además capaces de interaccionar con el respirasoma para estabilizarlo y protegerlo del daño oxidativo (14). Los tumores exitosos mantienen los niveles de ROS en unos márgenes que les permiten estimular la proliferación participando en las rutas de señalización que correspondan, sin llegar a ser citotóxicos (17,37).

Uno de los mecanismos por los que se aumenta esta capacidad antioxidante es con la activación del factor nuclear NRF2, que inducirá la transcripción de diversas proteínas antioxidantes como son las GPXs y las TXNs, así como la de enzimas que intervienen en la síntesis del glutathion reducido (GSH). Este factor juega un papel en la defensa antioxidante a través de su participación en la activación de enzimas que permiten aumentar los niveles citosólicos de NADPH, así como mediante la regulación de la ruta de biosíntesis de la serina para generar NADPH en la mitocondria; esta biomolécula es necesaria para que las GPXs y TXNs puedan mantener su acción antioxidante. De esta manera, los antioxidantes o factores como NRF2 tienen un papel importante en la tumorigénesis (5).



### 5.1.3. Fenómeno de hipoxia y ROS

Cuando un tumor se está desarrollando, la proliferación de las células tumorales se da a mayor ritmo que la angiogénesis, de manera que se termina produciendo una situación de hipoxia para un conjunto de las células que conforman el tumor (38). Ante una bajada de los niveles de oxígeno, el transporte electrónico es más lento por lo que aumenta la probabilidad de que los electrones se escapen y produzcan radicales libres. Sin embargo, otros estudios afirman lo contrario: que los niveles de ROS disminuirían en situación de hipoxia (39).

Siendo más concretos, se ha visto que mientras la oxidación causada por las ROS aumenta en el citosol y espacio intermembrana, disminuye en la matriz. Este resultado concuerda con el hecho de que a pesar de que las ROS son necesarias ante la falta de  $O_2$ , la estabilidad de los complejos del sistema OXPHOS aumenta en situación de hipoxia (39).

Se ha propuesto que CIII es el sensor mitocondrial de los niveles de oxígeno y que por tanto, es el que media las respuestas durante la hipoxia (39); y es precisamente este CIII, el único capaz de liberar ROS no solo en la matriz mitocondrial, sino también en el espacio intermembrana. Las ROS generadas por CIII van a ser uno de los mecanismos responsables de estabilizar el factor de transcripción HIF1, que es el que inicia la cascada de señalización hipóxica (39). Aunque no se sabe el mecanismo exacto, se piensa que el aumento en la producción de ROS se debe al sitio de unión a la ubiquinona que, ante bajas concentraciones de  $O_2$ , prolonga el tiempo de vida del radical semiquinona, lo que favorece la formación del ion superóxido (22).

Un aumento de ROS (siempre sin llegar a niveles de citotoxicidad), es fundamental para activar el HIF; sin embargo, las células sin HIF mantienen, en hipoxias prolongadas, niveles elevados de ROS que pueden llevar a la muerte celular. Esto sugiere que HIF-1 produce un feed-back negativo, disminuyendo los niveles de mtROS (ROS producidas por la mitocondria) para conseguir la supervivencia celular ante largos periodos de hipoxia (37).

Además de por el propio HIF1, las células sometidas a periodos prolongados de hipoxia, cambian la isoforma de la subunidad 4 del CIV, limitando así la generación de ROS. De esta manera, las células primero aumentan considerablemente los niveles de ROS para lograr estabilidad el factor HIF en situación de hipoxia y luego, restringen la producción de estas ROS para evitar el daño celular (37).

Parece que esta mayor producción inicial de ROS se debe a los efectos de la baja concentración de oxígeno sobre la ETC, en particular, sobre los complejos I, II y III (38). La hipoxia aumenta la producción de mtROS para estabilizar las subunidades del factor HIF $\alpha$  pero también lleva a una mayor estabilidad de los complejos I y IV, además del CIII, así como de los SCs (36). Esto se consigue porque mientras en la matriz mitocondrial disminuyen las ROS, la liberación de ROS al espacio intermembrana por parte del CIII aumenta (22) ya que la conformación no-activa del CI se ve favorecida, provocando una acidificación de la matriz, que se traduce la solubilización parcial del fosfato cálcico. Con el aumento del  $Ca^{++}$  libre, se activa el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  NCLX, elevándose la concentración de sodio en el interior mitocondrial. El sodio se asocia a los fosfolípidos de la membrana de manera que se reduce la fluidez de esta, dificultando el movimiento del transportador electrónico CoQ así como la reoxidación del ubiquinol a ubiquinona en el CIII. Al aumentar el tiempo de vida de la semiquinona, se favorece la generación del anión superóxido, que será expulsado al exterior mitocondrial por el CIII (40).

El aumento en la generación de ROS mitocondriales en los microambientes tumorales de hipoxia supone un mecanismo muy importante para promover el crecimiento, la supervivencia y la reprogramación metabólica (22).

#### **5.1.4. ROS y la metástasis**

A pesar de que no se conoce el perfil bioenergético de las células invasivas (metastásicas), sí que se sabe que favorecen la respiración mitocondrial y una mayor producción de ATP (35). De hecho, el aumento en la respiración mitocondrial así como la señalización por parte de las ROS son necesarias para la metástasis (5). Por tanto, las mitocondrias juegan un papel central en la diseminación de las células tumorales a órganos alejados.

La transición de fenotipo epitelial a mesenquimal que se produce en las células cancerosas, así como la adquisición de propiedades migratorias e invasoras, está acoplado a la biogénesis mitocondrial y al aumento de la fosforilación oxidativa, y ambos procesos están potenciados por el factor transcripcional PCG-1 $\alpha$ . Así, la expresión de PCG-1 $\alpha$  en las células cancerosas con capacidad invasiva está directamente relacionada con la formación de un tumor metastásico en una región lejana del organismo (35).

Las células epiteliales dependen de sus interacciones con la matriz extracelular (ECM) para sobrevivir, proliferar y diferenciarse. Cuando se despegan de la matriz, se activa un proceso apoptótico mediado por las caspasas denominado anoikis. Oncogenes como el ErbB2 son capaces de evitar este proceso (41).

Es un hecho que las ROS aumentan una vez las células se despegan de la matriz y en un primer momento, tienen un efecto positivo: modulan la expresión de integrinas, suprimen el proceso de anoikis, promueven cambios en la morfología de la superficie celular, en la comunicación intercelular y la movilidad celular y aumentan la permeabilidad vascular; todo esto facilitando el proceso de metástasis (26). Sin embargo, estas ROS terminan teniendo un efecto perjudicial para las células metastásicas. Las células que se han despegado de la matriz pueden encontrarse en una situación de falta de glucosa, ante lo que han desarrollado dos mecanismos para su supervivencia que terminan por verse truncados ante los niveles altos de ROS (41).

Por un lado, las células metastásicas producen ATP a través de una ruta alternativa independiente de la glucosa que puede ser inhibida por ROS como se demuestra en ensayos con antioxidantes como el Trolox. Por otro lado, las células cancerosas pueden obtener ATP a partir de la oxidación de los ácidos grasos (FAO), proceso que también inhibirían las ROS provocando un estado de falta de energía en la célula (41).

La forma de evitar el estrés metabólico de la situación es tanto el desarrollo de transportadores de glucosa independientes del anclaje así como la eliminación de las ROS que se generan, evitando que se produzca daño en el DNA; en esta situación los antioxidantes podrían favorecer el proceso de tumorigénesis (41). Esto podría parecer contradictorio con el hecho de que, en un principio, cuando las células están unidas a la matriz y aun no tienen fenotipo tumoral, el papel de los antioxidantes es, precisamente, evitar que se dé esta tumorigénesis.

Se puede concluir con respecto a la metástasis y las ROS que el aumento de la producción de ROS, disminuye la producción de ATP y suprime la proliferación celular y sin embargo, juega un

papel importante al inicio del proceso ya que aumenta la movilidad celular y por lo tanto la capacidad de generar metástasis. Se ha visto que niveles suaves de estrés oxidativo median la EMT favoreciendo la migración celular e invasión (42).

Para su posterior supervivencia, las células metastásicas deben activar rutas adaptativas que disminuyan los niveles de ROS (5). Una forma de lograr la detoxificación de las ROS es aumentando el flujo a través de la ruta de las pentosas fosfato (PPP) ya que se genera poder reductor en forma de NADPH (41). En esta tarea participan IDH1 e IDH2, que pueden transportar el NADPH a la mitocondria (5). Además, el flujo de la PPP es importante para que ErbB2 recupere los niveles de ATP que necesitan las células para sobrevivir y seguir dividiéndose (35,41).

## **5.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA**

La hipertermia (temperatura corporal o local anormalmente alta) se ha empleado, históricamente, como terapia frente al cáncer en combinación con otros tratamientos como son la quimioterapia o la radioterapia, ya que aumenta la sensibilidad de las células a las mismas y permite, de esta manera, dirigir de cierta forma el tratamiento. Este aumento de temperatura se puede aplicar sobre la región en la que está el tumor o en todo el organismo y se pueden seguir diversas estrategias para conseguirlo (44,45). Uno de los métodos que se ha empleado para el tratamiento de los tumores es la perfusión de sangre extracorporal a mayor temperatura; observándose efectos sobre el tumor tanto si se combina con la administración de agentes quimioterapéuticos como si no (45).

Se considera que las temperaturas de entre 36,1-37,2°C son “normales” y que, a partir de los 38°C, se puede hablar de fiebre (46), momento en el que el aumento de temperatura “va acompañado por un aumento del ritmo cardiaco y respiratorio, y manifiesta la reacción del organismo frente a alguna enfermedad” (Oxford Languages). Teniendo esto en cuenta, se han estudiado los efectos de distintas temperaturas por encima de estos valores.

En valores de en torno a los 40°C (temperaturas febriles) los efectos no están muy claros; pero a partir de hipertermias medias (42°C) se aprecia una disminución considerable de la eficiencia del proceso de fosforilación oxidativa (44,47); por esta razón, para provocar la muerte celular, se aplican temperaturas por encima de los 41-42°C. Hay que tener en cuenta que la respuesta a la temperatura depende de la línea celular, pero también de factores ambientales como el pH, así como del tiempo del tratamiento (44,48).

La importancia de tratamiento complementario con hipertermia en el cáncer radica en que las células tumorales son más sensibles al aumento de temperatura que las normales debido a algunas de las características que adquieren cuando se transforman (48). Cabe destacar que la hipertermia es particularmente eficaz en la eliminación de tumores sólidos, para los que no se habían encontrado tan buenos resultados con la radioterapia o quimioterapia (45). Cuando se aplica la quimioterapia, las células que quedan alejadas de los vasos sanguíneos reciben dosis de medicamentos más bajas. En esos casos, sería de gran utilidad el tratamiento combinado con hipertermia, ya que hay ciertos medicamentos cuya citotoxicidad aumenta con la temperatura y su acción podría llegar a las células más alejadas de la fuente de administración (45).

La principal característica de las células tumorales es que han perdido el control sobre su crecimiento y proliferan rápidamente, lo que causa que ciertas regiones de la masa celular

tumoral no estén bien irrigadas. La falta de vasos sanguíneos limita la capacidad de disipación del calor por parte del tejido de manera que se puede aplicar calor en una región, bajo condiciones concretas, afectando al tumor de manera selectiva. Además, su metabolismo energético depende mayoritariamente de la glicólisis y produce grandes cantidades de ácido láctico, lo que causa una bajada del pH y en consecuencia, un aumento de la sensibilidad de las células a la hipertermia (48).

Por otro lado, la disponibilidad de glucosa y oxígeno puede no ser suficiente para suplir las necesidades de todo el tejido tumoral mientras crece debido a la pobre vascularización y a la hipoxia que se produce; en células que no tienen una fuente de glucosa, la temperatura inhibe la respiración celular y, por tanto, aumentan los ratios AMP/ATP y  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , disminuyendo el estado energético de la célula y causando finalmente la muerte celular (48,49).

Sin embargo, no todas las células del tejido tumoral se encuentran en situaciones de baja irrigación o microambientes ácidos o con falta de nutrientes y el calor tenderá a favorecer la muerte de las células que se encuentren en peores condiciones, que son las que resisten a otros tratamientos por estar más alejadas de los vasos (45,48). La sensibilidad a la temperatura de las células tumorales en ambientes 'normales' es similar a la de las células no transformadas; es por esto que para el tratamiento efectivo del tumor, se combina la hipertermia con radioterapia o quimioterapia o se busca aplicar tratamientos localizados (48).

No se conocen todos los mecanismos a nivel molecular por los que se da la muerte celular ante un incremento en la temperatura, pero sí se sabe que la célula se altera a varios niveles viéndose afectados la membrana, el citoesqueleto, la síntesis y estabilidad de macromoléculas y la reparación del DNA. Además, la temperatura también regula los niveles de expresión de diversos genes que codifican proteínas que afectarán al funcionamiento celular como son, por ejemplo, las proteínas de choque térmico (HSP) (44).

Que se produzca la apoptosis por hipertermia depende en buena parte del estado energético celular y, por tanto, de las mitocondrias; sobre todo, en el inicio y regulación del proceso de apoptosis (47).

#### **5.2.1. Hipertermia y disrupción de la función mitocondrial**

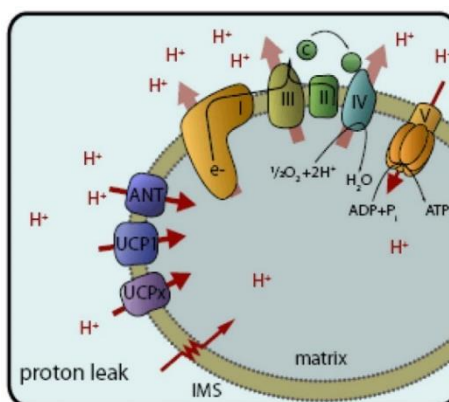
En general las enzimas van a aumentar su actividad con el incremento de temperatura en un determinado factor  $f$ , característico para cada una de ellas, hasta una temperatura máxima a partir de la cual se empieza a producir su inactivación y posterior desnaturalización. Sin embargo, aunque esta hiperactivación se aprecia para las enzimas aisladas, en muchos casos no se observa cuando se estudia la enzima en su contexto biológico (dentro de la célula), por lo que se deduce que debe haber algún efecto que enmascare su activación con la temperatura (50).

En valores superiores pero próximos a la temperatura fisiológica, en torno a los 40°C, hay discrepancias sobre si se desacopla o no el proceso de fosforilación oxidativa ya que no se observan diferencias en la respiración mitocondrial, de manera que, aunque se diese el desacoplamiento, estaríamos ante un cambio reversible (47,51). Sin embargo, se ha visto que a partir de los 42°C se producen cambios en las propiedades físicas de las membranas, condicionando las interacciones lípido-proteína y afectando a las funciones biológicas ya que se inhibe la cadena respiratoria. De hecho, se han detectado cambios irreversibles en el proceso

de fosforilación oxidativa independientemente de si los electrones entran por el CI (usando como sustratos piruvato + malato) o por el CII (succinato como sustrato) (47). Con el incremento de temperatura, también aumentan la energía liberada en la hidrólisis del ATP y el consumo de oxígeno. Esto lleva a pensar que produce una disociación entre el potencial de membrana y su uso para la síntesis de ATP, es decir, se está disipando el gradiente de protones (50).

A partir de los 43-45°C, además de la alteración progresiva del sistema OXPHOS, se produce un aumento de la permeabilidad de la membrana debido a que, con la temperatura, disminuye la organización de la membrana mitocondrial interna, permitiendo la entrada de agua, que se intercala con los lípidos (47,50,51). Con el aumento de la permeabilidad, los  $H^+$  podrán entrar directamente a la matriz, sin tener que pasar necesariamente por la ATP sintasa, con lo que disminuye el potencial de membrana para la síntesis de ATP (50). Los protones también podrán entrar de nuevo a la matriz gracias a transportadores como las proteínas desacoplantes UCP o las translocasas del nucleótido adenina o ANT que se activan por el anión superóxido o productos de la peroxidación, que se van a generar en situación de estrés térmico como se verá a continuación (52). A partir de los 50-52°C, las mitocondrias pierden completamente su función energética y, de hecho, pasan a ser consumidoras de la energía celular (47).

De esta manera, un efecto principal de la hipertermia es la disrupción de la función mitocondrial mediante el aumento de la pérdida de protones a través de la membrana interna, disminuyendo el ratio entre la síntesis de ATP y el oxígeno consumido (50,51). Además, esta alteración del potencial de membrana también va a afectar al transporte de proteínas de la célula a la matriz mitocondrial alterando la función metabólica del orgánulo (53).



*Figura 5. Entrada de los protones a la matriz a través de la membrana interna por difusión o gracias al transporte de proteínas como las ANT o las UCPx (Jastroch M et al., 2011).*

Sin embargo, la fluidez de la membrana y la consiguiente pérdida de su potencial no es lo único que cambia en la mitocondria con el aumento de temperatura. Se ha establecido que las mitocondrias son los mediadores centrales de la disfunción celular causada por la hipertermia y se ha sugerido que detrás de este daño se encuentran el estrés oxidativo y la pérdida de control en la homeostasis del calcio (54).

La alteración de la homeostasis del calcio causada por el fallo en la fosforilación oxidativa retroalimenta el sistema, de manera que, cuando se da el desacople entre el transporte electrónico y la producción de ATP, también se inactiva la Ca-ATPasa, alterando los niveles de  $Ca^{++}$  (55). Este  $Ca^{++}$  citosólico es, a su vez, regulador de las enzimas de la cadena respiratoria, aumentando la actividad mitocondrial de manera que se produce mayor cantidad de ROS

(55,56). La disregulación de la concentración de calcio puede llevar incluso a revertir el sentido de la fosforilación oxidativa, agravando el desacoplamiento del proceso (55).

Un componente de membrana importante, sensible a este aumento de ROS y a la sobrecarga de calcio intracelular causados por el estrés térmico, es el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PMP). Este complejo proteico está en la membrana interna mitocondrial y su apertura provocada por la hipertermia supone la liberación de proteínas que llevarán a la activación de las caspasas (55). También contribuye a la disminución del potencial redox y al desacoplamiento de los componentes de la cadena respiratoria, aumentando la producción de ROS (55,56), favoreciendo la liberación del  $\text{Ca}^{++}$  mitocondrial, del citocromo c, etc., lo que contribuye a desencadenar la apoptosis (55).

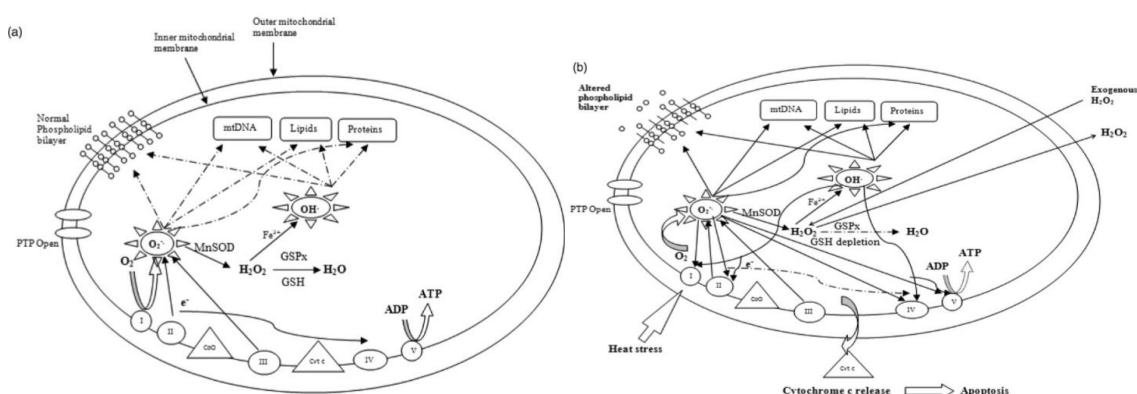


Figura 6. Generación y objetivos de las ROS en las mitocondrias en condiciones (a) normotérmicas, (b) hipertérmicas. (Slimen et al., 2014)

El estrés térmico se asocia con cambios en la arquitectura de las crestas mitocondriales, así como con una asociación disfuncional entre los complejos de la ETC de manera que aumenta la producción de ROS, de cuyas consecuencias ya se ha hablado en el apartado 4.2. (54). Cabe destacar que las ROS van a oxidar los grupos tiol de los complejos respiratorios I, II, IV y V y a generar grupos carbonilo en diversas enzimas glicolíticas mediante la oxidación de aminoácidos como la Arg, Lys, Pro, His, Ser o Thr, alterando su función (57). El CI es particularmente sensible al estrés térmico ya que reduce bastante su actividad, liberando el anión superóxido (58); este complejo puede llegar incluso a inactivarse totalmente por el calor mediante su disociación en subcomponentes, reduciendo así el flujo electrónico de la ETC; todo ello se traduce en una menor tasa de respiración y por tanto, de síntesis de ATP. Como consecuencia, el estado de los componentes de la cadena de transporte electrónico pasa a ser reducido y va a aumentar la síntesis de superóxido (57).

También contribuyen al aumento de la concentración de ROS la disminución que se da de las defensas antioxidantes no enzimáticas, así como la alteración de las defensas enzimáticas, llevando a un desequilibrio entre la producción de ROS y su eliminación (57,58).

La despolarización de la membrana y la producción de ROS alteran la estabilidad de las proteínas, de manera que estas se vuelven más sensibles a la desnaturalización por el calor (57,59). Las proteínas dañadas se desplegarán, exponiendo sus grupos hidrofóbicos de manera que tienden a agregarse entre ellas por la interacción de estos. Los daños en las proteínas suelen ser reversibles mientras la temperatura no supere los 47°C, dependiendo del tiempo de

tratamiento, gracias a la acción de las chaperonas como HSP70; sin embargo, a partir de esta temperatura, el daño será irreversible incluso en tratamientos cortos (59).

En el caso de los componentes del sistema de fosforilación oxidativa, se ha comprobado que su función se ve completamente inhibida antes de alcanzar las temperaturas necesarias para su desnaturalización en el ambiente lipídico. Esto reafirma que es la estabilidad de las interacciones entre los propios complejos y con los lípidos que conforman su medio ambiente lo que lleva a la pérdida de la función mitocondrial (47). Por otra parte, tiene particular interés la desnaturalización de las proteínas que están empaquetando el DNA, así como la de aquellas que participan en la transcripción y reparación de daños del material genético. De esta manera, la hipertermia provoca inestabilidad genómica, contribuyendo por otra vía adicional a la inducción de la apoptosis (59).

El daño en la mitocondria, sobre todo a nivel de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y aumento en la producción de ROS, es un desencadenante de la señalización apoptótica a través de biomoléculas como son Bax, Apaf-1 y la CASP3, que se activan tras una serie de eventos que se producen en las 2h siguientes a la inducción del daño térmico (54).

Por su parte, se ha descrito que los eventos de mitofagia para eliminar las mitocondrias dañadas se activan 6h después de la inducción del daño térmico. Aumenta entonces la presencia de Bnip3l, que es un receptor que interacciona con LC3 para el reclutamiento de autofagosomas en las mitocondrias. También se aumenta la presencia de Fis1, que actúa como mediador de la fisión mitocondrial (54). Por tanto, otro efecto del daño oxidativo por el aumento de temperatura es un exceso en la fisión o fragmentación mitocondrial que se relaciona con patologías como son la diabetes, el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y las cardiovasculares (60). Otro mediador de este aumento de la fragmentación y, por tanto, de la inducción de la apoptosis por el calor, es la proteína tipo Dynamin-1 (Drp1). No se sabe por qué su expresión aumenta con la temperatura, aunque se ha demostrado que coincide con el aumento de las ROS. Se piensa que es la activación de p53 la que favorece su transcripción. Entre las funciones apoptóticas de Drp1 destacan, además del incremento de la fisión mitocondrial, un aumento en la permeabilización de la membrana (ya que favorece la entrada de los protones a la matriz mitocondrial a través de las UCPs) y la consiguiente pérdida del potencial, así como la liberación del cyt c al espacio intermembrana que activará la cascada apoptótica (60).

En conclusión, todos los efectos de la temperatura en la mitocondria (los cambios en las propiedades de la membrana y por tanto de las interacciones entre lípidos y proteínas así como entre las proteínas que forman los SCs; el aumento de la permeabilidad de la membrana con la consecuente pérdida de potencial y transporte de proteínas necesarias para la función mitocondrial; la disminución de las defensas antioxidantes y el estrés oxidativo; la pérdida de la homeostasis del calcio y la desnaturalización de proteínas que participan en la transcripción y reparación de daños del material genético), terminan interrelacionándose entre sí y conducen a la célula, en particular a aquellas con un fenotipo tumoral, hacia el proceso de muerte celular.

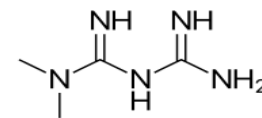
### **5.3. EFECTOS DE LOS FÁRMACOS**

Hasta ahora se ha visto que los procesos de producción de ROS y aumento de la temperatura son capaces de afectar a las células tumorales a través de su acción sobre la homeostasis del sistema OXPHOS, lo que los hace muy interesantes a la hora de buscar tratamientos para el

cáncer. De la misma manera, se ha estudiado la posibilidad de que compuestos sintéticos o fármacos puedan tener propiedades antitumorales mediante su acción sobre la mitocondria. Aunque hay muchos compuestos con efectos en el orgánulo (Cispt, análogos de nucleótidos, antioxidantes...) nos centraremos en la metformina y el dicloroacetato, por su acción más directa sobre la producción de energía.

### 5.3.1. Metformina

La metformina o 1,1-dimetilbiguanida (*Figura 8*) es un compuesto hidrofílico cargado positivamente a pH fisiológico (61). Su baja afinidad por los lípidos supone una limitación a la hora de entrar en la célula a través de la bicapa lipídica, por lo que necesita de transportadores para ello. Destacan las proteínas de transporte de cationes orgánicos (OTCs) 1-3 o el transportador monoamina plasmático (PMAT); que además, confieren una especificidad del transporte a nivel de órgano (61–63). Las células con un fenotipo tumoral expresan OTC1 en su membrana, permitiendo la entrada del fármaco (63). Así, la concentración celular de la metformina dependerá de la presencia y actividad de estos transportadores (61).



*Figura 7. Estructura química de la metformina (Wikipedia)*

En principio la metformina es un compuesto empleado para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (T2D) ya que inhibe el proceso de gluconeogénesis hepática impidiendo la transcripción de los genes que codifican proteínas clave de este proceso, favorece la captación de glucosa por parte del músculo esquelético y aumenta la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, se le han adjudicado nuevas propiedades entre las que está la mejora del pronóstico de pacientes con cáncer así como la prevención del inicio del desarrollo tumoral (64,65).

Dos posibles vías de acción han sido descritas para explicar el efecto antitumoral de la metformina. La primera, la indirecta, se basa en la acción frente a la diabetes ya vista: se reduce la producción de glucosa por parte del hígado y aumenta la captación de esta por parte del músculo, disminuyendo con todo ello la proliferación celular (63). Se ha visto que la metformina también afecta a los procesos inflamatorios, que tienen su papel en la progresión tumoral: se bloquea la transcripción del factor NF-κB, disminuyendo la secreción de citoquinas proinflamatorias al mismo tiempo que se activa la respuesta inmune contra las células tumorales (64,66). Por otro lado, la metformina inhibe las rutas que regulan el HIF, importante en los tumores para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno, dificultando la supervivencia tumoral (66). Por último, la vía directa supone la inhibición del complejo I de la ETC por parte del fármaco con diversas consecuencias que se mencionan más adelante (63).

Se han propuesto dos hipótesis para explicar la acción del fármaco sobre el complejo I. La primera propone que su carga positiva favorecería su acumulación gracias al potencial negativo que se genera en la membrana interna con el bombeo de protones; esto además, le permitiría alcanzar la concentración necesaria en el orgánulo para llevar a cabo su acción, alcanzando niveles del orden de mM (frente a su presencia μM en el plasma) (61,62). Sin embargo, no se ha descrito ningún transportador ni se ha logrado detectar su acumulación en las mitocondrias sobre las que se sabe que está actuando (61). La segunda hipótesis propone que la metformina activase, a través de un receptor de membrana, alguna compleja ruta de señalización que lleve finalmente a la inhibición del CI. A favor está el hecho de que existan dos conformaciones para el complejo, una activa y la otra inactiva, así como que éste posea grupos tiol susceptibles de



ser modificados post-traduccionalmente y, sin embargo, tampoco se ha podido identificar esta cascada todavía. A día de hoy está más aceptada la primera hipótesis (61).

### 5.3.1.1. Acción en la célula tumoral

Se ha establecido un efecto dependiente del tiempo por parte de la metformina, lo que cuadra con una entrada progresiva en el orgánulo de manera que poco a poco se incrementa su acción sobre la ETC. Además, el propio compuesto limita su acción ya que al concentrarse en la matriz mitocondrial e inhibir la ETC, irá cayendo el potencial de membrana evitando que la molécula pueda seguir entrando (67).

A la hora de determinar cómo interacciona el compuesto con el CI, se han hecho diversas observaciones. Por un lado, la inhibición del CI se da en animales, bacterias, levaduras... por lo que se une a alguna subunidad conservada filogenéticamente. Por otro lado, se ha determinado que la inhibición es inmediata en el estado inactivo y tarda más en el activo, sugiriendo una preferencia por la conformación en la que los dominios redox y de transporte de  $H^+$  no están unidos tan eficientemente. Esto ha llevado a proponer el *loop* de la subunidad ND3 entre estas regiones como el sitio de unión de la metformina, estabilizando la conformación inactiva (62).

Una vez se inhibe el CI, se suceden una serie de consecuencias que promueven el efecto antitumoral del fármaco. La que se considera la principal ruta se inicia con la disminución de la producción de ATP por la inhibición del CI, lo que lleva al aumento de los niveles de ADP y AMP y un incremento del ratio AMP:ATP que provoca la activación de la AMPK (adenosín monofosfato proteína quinasa) (64,65,67).

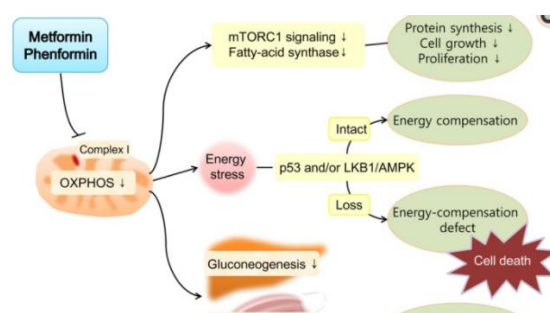


Figura 8. Efecto de la metformina en el metabolismo energético de las células tumorales (Choi et al., 2013)

La AMPK es un sensor de la situación energética celular y ante su activación bajo situaciones de estrés, detiene los procesos de consumo de ATP como pueden ser la síntesis de lípidos y proteínas a través de la inhibición de la ruta de señalización del complejo mTORC1 (65), de manera que inhibe la proliferación y crecimiento celular para que se puedan restaurar los niveles de ATP; esto le confiere una función supresora tumoral (64,65). También participan en la regulación del ciclo celular oncogenes y supresores tumorales regulados por la AMPK como es la proteína D1, que se verá inhibida deteniendo el ciclo celular en G1 (64). Si además, como se da en muchos casos en células tumorales, hay algún defecto genético como pueden ser la pérdida de p53 o de la quinasa hepática B1 (LKB1, encargada de activar la AMPK fosforilándola) que no permita esta regulación del metabolismo energético, la célula terminará por morir (65).

Hay que tener en cuenta que la célula tiene otras rutas para generar ATP, por lo que el efecto de la metformina va a depender de la glucosa disponible en el ambiente celular. Ante la ausencia del sustrato, la metformina lleva a la muerte celular inmediata, mientras que si hay glucosa en el ambiente celular, se dará una ralentización del crecimiento tumoral (66).

Por otro lado, la inhibición del CI también va a disminuir la producción de ROS ya que los principales generadores son éste y el CIII, de manera que disminuirá el daño sobre el DNA y las posibles mutaciones derivadas así como el estrés que supone el incremento de las ROS (62,64).

Las ROS son- además, como ya se ha indicado,- señalizadores en muchas rutas que ahora se verán truncadas (62).

### 5.3.2. Dicloroacetato

El dicloroacetato o DCA es un compuesto con la capacidad de penetrar la mayor parte de los tejidos (a través de los transportadores de piruvato y monocarboxilato) debido a su pequeño tamaño y estructura; y cuya diana es la mitocondria, afectando al metabolismo celular. Aunque no actúa directamente sobre la ETC, sí tiene consecuencias sobre la misma (68).

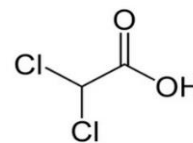


Figura 9. Estructura química del DCA (cancerquest.org)

La acción del DCA se basa en que la mitocondria es un orgánulo principal en el cambio metabólico que se da en las células tumorales hacia un fenotipo basado en la glicólisis en lugar de en la fosforilación oxidativa (Efecto Warburg) de manera que revierte esta adaptación del metabolismo energético dificultando la proliferación de las células cancerosas (68).

Se ha determinado que en las células cancerosas, la membrana está hiperpolarizada, lo que por un lado se relaciona con un estado celular anti-apoptótico y por otro, con una menor actividad mitocondrial, ya que entra menor piruvato en el orgánulo, disminuyendo el flujo de la fosforilación oxidativa y contribuyendo así al fenotipo tumoral (68). Es aquí donde entra en juego el DCA, cuya diana es el complejo piruvato deshidrogenasa (PDC), que tiene como función convertir el piruvato en acetil-coA para que pueda entrar al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y seguir la fosforilación oxidativa, siendo la etapa limitante de este proceso. Así, el DCA activa el PDC, logrando desviar el flujo hacia la fosforilación oxidativa, lo que se traduce en una menor capacidad proliferativa y crecimiento del tumor (68–70); también despolarizará la membrana a niveles típicos de células no cancerosas y reactivará el procesos de apoptosis mediado por la mitocondria para células tumorales (68).

El DCA sigue dos mecanismos en su modo de acción: por un lado, inhibe la expresión de la piruvato DH quinasa (PDK) y así mantiene el PDC en su estado activo, que es el desfosforilado; por otro lado induce la estabilización directa del complejo PDC, evitando su pérdida (69).

Además, al contrario de lo que cabría pensar por la mayor producción de ROS e inducción de hipoxia como consecuencia de la acción del DCA, el factor HIF1 $\alpha$  se va a ver inhibido (69,70). Este factor es uno de los principales causantes del fenotipo tumoral y se piensa que su inhibición ante la presencia del DCA se debe al descenso de las concentraciones de piruvato y lactato, y la inducción de la expresión de p53 que favorece la degradación de HIF1 $\alpha$  provocados por el DCA. Además, la inhibición de la PDK probablemente cause la desestabilización del HIF $\alpha$ . Este factor actúa a muchos niveles, entre los que destacan: la inducción de la glicólisis aeróbica e inhibición del PDC, la expresión de transportadores de glucosa o la alteración del CIV favoreciendo la isoforma más activa; todo ello con el objetivo de favorecer la proliferación tumoral (69). Así, el DCA no solo disminuye la glicólisis aeróbica dificultando la obtención de intermediarios para la síntesis de biomoléculas en el crecimiento células, sino que también impide otros cambios fenotípicos que se dan, dificultando la supervivencia de las células tumorales.

Por último, se ha determinado que el DCA, además de su facilidad para llegar a su diana y los múltiples procesos sobre los que actúa para dificultar la proliferación tumoral, no tiene ningún efecto sobre las células con fenotipo normal, siendo un tratamiento selectivo (69).

## 6. CONCLUSIONES

---

- En células tumorales, las ROS alcanzan niveles tumorigénicos gracias a un equilibrio adecuado entre su generación y la producción de defensas antioxidantes
- Las ROS en células tumorales actúan como segundos mensajeros a nivel de proliferación celular, adaptación metabólica, apoptosis y expresión génica.
- Las ROS causan daño en la mitocondria a tres niveles: (i) acumulan mutaciones en el mtDNA, (ii) oxidan los complejos mitocondriales y (iii) oxidan la cardiolipina; todos ellos conducen a una mayor producción de ROS
- En las células tumorales bajo condiciones de hipoxia, las ROS son necesarias para activar el factor HIF y lograr así su supervivencia
- En la adquisición de propiedades migratorias e invasoras, las células tumorales necesitan unos niveles elevados de ROS, pero una vez se han despegado de la matriz, las células metastásicas deben reducir los niveles de ROS para garantizar su supervivencia
- Las temperaturas por encima de la fisiológica desestabilizan la membrana plasmática y las interacciones de los complejos entre ellos y con su entorno, llevando a un aumento de las ROS que, al estar en niveles citotóxicos, conducen a la muerte celular.
- La Metformina inactiva el CI reduciendo la producción de ROS y de ATP, por lo que el metabolismo anabólico debe detenerse, ralentizando la proliferación tumoral y pudiendo causar la muerte celular
- Dado el papel central de la mitocondria, y en particular del sistema OXPHOS, en el desarrollo y progresión de los tumores, la búsqueda de nuevos tratamientos cuya diana sea este sistema permite abrir nuevas posibilidades con una cierta especificidad por las células tumorales

## 6. CONCLUSIONS

---

- In tumour cells, ROS reach tumorigenic levels thanks to an adequate balance between their generation and the synthesis of antioxidant defences
- ROS in tumour cells act as second messengers in pathways related to cell proliferation, metabolic adaptation, apoptosis, and gene expression
- ROS damage the mitochondria at three levels: (i) mutation accumulation on mtDNA, (ii) oxidation of mitochondrial complexes and (iii) oxidation of cardiolipin; all of them causing an increase in ROS production
- Under hypoxia conditions, tumour cells need ROS to activate the HIF factor and thus, survive
- For the acquisition of migratory and invasive properties, tumour cells need high levels of ROS, but once they have detached from the matrix, metastatic cells must reduce ROS levels to guarantee their survival
- Temperatures above the physiological one destabilizes the plasmatic membrane and the interactions between the complexes and with their environment, which causes increase in ROS that reach cytotoxic levels, leading to cell death
- Metformin inactivates CI decreasing ROS and ATP production so anabolic metabolism must stop, slowing tumour proliferation and maybe, leading to cell death
- As mitochondria and, particularly the OXPHOS system, have a central role in the development and tumour progression, the search of new treatments that target this system allows opening new possibilities with a certain specificity for tumour cells.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Douglas H, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell Press*. 2000;100(1):57–70.
2. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 2001;167–223.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. Annibaldi A, Widmann C. Glucose metabolism in cancer cells. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(4):466–70.
5. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab*. 2008;7(1):11–20.
6. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703–7.
7. Zheng J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (review). *Oncol Lett*. 2012;4(6):1151–7.
8. Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2015;11(1):9–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1712>
9. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the Origin of Cancer Metastasis. *Natl Institutes Heal*. 2013;18(1–2):43–73.
10. Day SB. Cancer invasion and metastasis : biologic mechanisms and therapy. *Progress in cancer research and therapy*. 1977. XXII, 518 s.
11. Alberts, Johnson, Lewis, Roberts, Raff, Walter. *Molecular Biology of the Cell*. In 2008. p. 815–8.
12. Boekema EJ, Braun HP. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem*. 2007;282(1):1–4.
13. Dudkina N V., Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: Mitochondrial supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(5):419–24.
14. Moreno-Loshuertos R, Enríquez JA. Respiratory supercomplexes and the functional segmentation of the CoQ pool. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2016;100:5–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.018>
15. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enríquez JA. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol Cell*. 2008;32(4):529–39.
16. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colaś C, Balsa E, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* (80- ). 2013;340(6140):1567–70.
17. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell* [Internet]. 2016;166(3):555–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002>
18. Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell* [Internet]. 2016;61(5):667–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011>
19. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012;12(10):685–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3365>
20. Chandra D, Singh KK. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2011;1807(6):620–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.023>
21. Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Movilla N, Pérez-Martos A, De Cordoba SR, et al. Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet*. 2006;38(11):1261–8.
22. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*. 2014;14(11):709–21.
23. Hancock J, Desikan R, Neill S. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society*. 2001.
24. Finkel T. From sulfenylation to sulphydration: What a thiolate needs to tolerate. *Sci Signal*. 2012;5(215).
25. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* 2. 2016;
26. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochem J*. 2007;401(1):1–11.
27. Gasparre G, Porcelli AM, Lenaz G, Romeo G. Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(2):1–17.
28. Tan AS, Baty JW, Dong LF, Bezawork-Geleta A, Endaya B, Goodwin J, et al. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab* [Internet]. 2015;21(1):81–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.003>
29. Giampazolias E, Tait SWG. Mitochondria and the hallmarks of cancer. *FEBS J*. 2016;283(5):803–14.
30. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 1998 Aug 10;1366(1–2):53–67.
31. Robinson NC. Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr*. 1993;25(2):153–63.
32. Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, et al. Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *J Biol Chem*. 2003;278(52):52873–80.
33. Forsmark-Andrée P, Lee CP, Dallner G, Ernster L. Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(3):391–400.
34. Cardoso SM, Pereira C, Oliveira CR. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(1–2):3–13.
35. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. Phosphorylation To Promote Metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(10):992–1003.
36. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive species and cancer. *Cancer Metab*. 2014;2(17).
37. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012;48(2):158–67.
38. Tafani M, Sansone L, Limana F, Arcangeli T, De Santis E, Polese M, et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
39. Díaz F, Enríquez JA, Moraes CT. Cells Lacking Rieske Iron-Sulfur Protein Have a Reactive Oxygen Species-Associated Decrease in Respiratory Complexes I and IV. *Mol Cell Biol*. 2012;32(2):415–29.
40. Hernansanz-Agustín P, Choya-Foces C, Carregal-Romero S, Ramos E, Oliva T, Villa-Piña T, et al. Na<sup>+</sup> controls hypoxic signalling by the mitochondrial respiratory chain. *Nature*. 2020;(February 2018).

41. Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Irie HY, Gao S, et al. NIH Public Access. 2010;461(7260):109–13.
42. Altieri DC. Mitochondrial dynamics and metastasis. NHS Public Access. 2019;76(5):827–35.
43. Jiang L, Shestov A, Swain P, Yang C, Parker SJ, Wang QA, et al. Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature* [Internet]. 2016;532(7598):255–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4749027&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
44. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*. 2002;3(8):487–97.
45. Hahn GM. Metabolic Aspects of the Role of Hyperthermia in Mammalian Cell Inactivation and Their Possible Relevance to Cancer Treatment. *Cancer Res*. 1974;34(11):3117–23.
46. Temperatura corporal normal: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [cited 2020 Jul 15]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001982.htm>
47. Žukienė R, Naucienė Z, Šilkūnienė G, Vanagas T, Gulbinas A, Zimkus A, et al. Contribution of mitochondria to injury of hepatocytes and liver tissue by hyperthermia. *Med*. 2017;53(1):40–9.
48. Gerweck LE. Hyperthermia in Cancer Therapy: The Biological Basis and Unresolved Questions. *Cancer Res*. 1985;45(8).
49. Haveman J, Hahn GM. The role of energy in hyperthermia-induced mammalian cell inactivation: A study of the effects of glucose starvation and an uncoupler of oxidative phosphorylation. *J Cell Physiol*. 1981;107(2):237–41.
50. Willis WT, Jackman MR, Bizeau ME, Pagliassotti MJ, Hazel JR. Hyperthermia impairs liver mitochondrial function in vitro. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2000;278(5 47-5):1240–6.
51. Zukiene R, Nauciene Z, Ciapaite J, Mildaz'ienė V. International Journal of Hyperthermia Acute temperature resistance threshold in heart mitochondria: Febrile temperature activates function but exceeding it collapses the membrane barrier. *Int J Hyperth* [Internet]. 2010 [cited 2020 Jul 3];26(1):56–66. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ihyt20>
52. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem* [Internet]. 2010 [cited 2020 Jul 5];47:53–67. Available from: </pmc/articles/PMC3122475/?report=abstract>
53. Vogt S, Irsusi M, Naraghi H, Sattler A, Ruppert V, Weber P, et al. Mitochondrial active and relaxed state respiration after heat shock mRNA response in the heart. *J Therm Biol* [Internet]. 2019;80(May 2018):106–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.01.007>
54. Ganesan S, Pearce SC, Gabler NK, Baumgard LH, Rhoads RP, Selsby JT. Short-term heat stress results in increased apoptotic signaling and autophagy in oxidative skeletal muscle in *Sus scrofa*. *J Therm Biol* [Internet]. 2018;72(September 2017):73–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.01.003>
55. Qian L, Song X, Ren H, Gong J, Cheng S. Mitochondrial mechanism of heat stress-induced injury in rat cardiomyocyte. *Cell Stress Chaperones* [Internet]. 2004 Sep [cited 2020 Jul 2];9(3):281–93. Available from: </pmc/articles/PMC1065287/?report=abstract>
56. Chang L, Daly C, Miller DM, Allen PD, Boyle JP, Hopkins PM, et al. Permeabilised skeletal muscle reveals mitochondrial deficiency in malignant hyperthermia-susceptible individuals. *Br J Anaesth* [Internet]. 2019;122(5):613–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.02.010>
57. Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperth*. 2014;30(7):513–23.
58. Huang C, Jiao H, Song Z, Zhao J, Wang X, Lin H. Heat stress impairs mitochondria functions and induces oxidative injury in broiler chickens. *J Anim Sci*. 2015;93(5):2144–53.
59. Roti JLR. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): Cell killing and molecular events. *Int J Hyperth* [Internet]. 2008 [cited 2020 Jul 3];24(1):3–15. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ihyt20>
60. Yu T, Ferdjallah I, Elenberg F, Chen SK, Deuster P, Chen Y. Mitochondrial fission contributes to heat-induced oxidative stress in skeletal muscle but not hyperthermia in mice. *Life Sci* [Internet]. 2018;200(February):6–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.031>
61. Fontaine E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(December):23–8.
62. Vial G, Demaille D, Guigas B. Role of Mitochondria in the Mechanism(s) of Action of Metformin. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2019 May 7 [cited 2020 Jul 31];10(MAY):294. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00294/full>
63. Heckman-Stoddard B, DeCensi A, Sahasrabudde V, Ford L. Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence. *PMC*. 2017;60(9):1639–47.
64. Podhorecka M, Ibanez B, Dmoszyńska A. Metformin-its potential anti-cancer and anti-aging effects Metformina-potencjalne działanie przeciwnowotworowe i przeciwstarzeniowe metformin • cancer • aging • AMPK • mTOR. *Rev Postep Hig Med Dosw* [Internet]. 2017;71:170–5. Available from: [www.phmd.pl](http://www.phmd.pl)
65. Choi YK, Park KG. Metabolic roles of AMPK and metformin in cancer cells. Vol. 36, *Molecules and Cells*. Korean Society for Molecular and Cellular Biology; 2013. p. 279–87.
66. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*. 2014;2014(3):1–18.
67. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* [Internet]. 2000 Jun 15;348(3):607–14. Available from: </pmc/articles/PMC1221104/?report=abstract>
68. Michelakis ED, Webster L, Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2008;99:989–94. Available from: [www.bjancer.com](http://www.bjancer.com)
69. Kankotia S, Stacpoole PW. Dichloroacetate and cancer: New home for an orphan drug? *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2014;1846(2):617–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.08.005>
70. Sutendra G, Dromparis P, Kinnaird A, Stenson TH, Haromy A, Parker JMR, et al. Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1a signaling and angiogenesis in cancer. *Oncogene*. 2013;32(13):1638–50.